



①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①1 N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

2 672 231

②1 N° d'enregistrement national :

91 01169

⑤1 Int Cl<sup>5</sup> : B 01 J 19/22; G 05 D 23/19//C 12 Q 1/68

⑫

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 01.02.91.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la  
demande : 07.08.92 Bulletin 92/32.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche : *Se reporter à la fin du présent fascicule.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : EIBET, Société Anonyme n°  
379612260 (Institut Européen de Biologie Industrielle  
et de Toxicologie de l'Environnement) — FR.

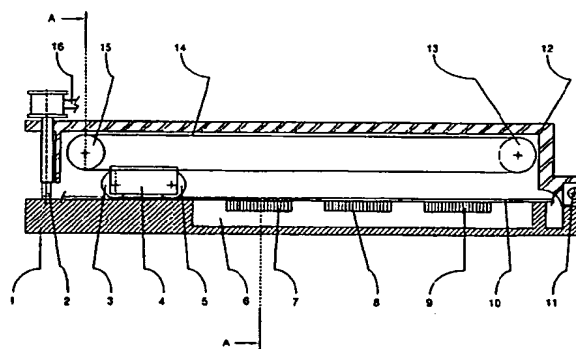
⑦2 Inventeur(s) : Larzul, Daniel, Michel et Paubert-  
Braquet, Monique.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire :

⑤4 Appareil d'exécution automatique répétée d'un cycle thermique, notamment pour l'amplification du nombre d'une séquence définie d'acide nucléique.

⑤7 Appareil d'exécution automatique répétée d'un cycle thermique permettant le traitement d'au moins un échantillon biologique caractérisé par le fait, d'une part que l'échantillon biologique est mis en mouvement à l'intérieur d'une enceinte du type capillaire souple (10) entre au moins deux zones thermorégulées (7,8,9), d'autre part que le système d'entraînement de l'échantillon biologique comporte au moins un galet (3,5) écrasant le capillaire (10), et tel que le déplacement du dit système d'entraînement le long du capillaire ait un effet d'entraînement de l'échantillon biologique à l'intérieur du capillaire.



FR 2 672 231 - A1



La présente invention s'applique à l'automatisation de tous procédés biologiques structurés comme une succession de cycles fonctionnellement identiques, chaque cycle étant composé d'au moins deux étapes thermiques consécutives. Dans l'état actuel de nos connaissances en biologie, le seul procédé répondant aux caractéristiques précédemment citées et comportant au moins 5 cycles, mais préférentiellement 15 à 40, est la réaction en chaîne de la polymérase (Saiki et col., 1985), plus couramment appelée technique PCR ("Polymerase Chain Reaction"). La PCR peut être utilisée dans de nombreux domaines liés à la recherche en biologie, mais son secteur privilégié d'application est le diagnostic biologique, qu'il s'agisse de la santé humaine, de la santé animale ou de l'agro-alimentaire. En santé humaine et animale, un tel diagnostic s'applique à la mise en évidence d'une infection par un pathogène et à la détection de maladies génétiques. En agro-alimentaire, ce diagnostic s'applique à la mise en évidence dans les denrées alimentaires d'un contaminant tel qu'un micro-organisme pathogène.

De manière générale, les techniques de biologie moléculaire utilisant l'hybridation moléculaire entre acides nucléiques permettent de diagnostiquer une infection par un pathogène avec une sensibilité et une spécificité très supérieures à celles obtenues avec les tests immunologiques. Malheureusement, les techniques de biologie moléculaire précitées ne sont utilisées que pour la recherche (Sambrook J. et col., 1989), alors que les techniques immunologiques sont employées de manière courante pour les diagnostics de routine.

A titre d'exemple, une infection virale chez un individu ne peut, en routine, être décelée que à l'aide de tests immunologiques. En effet, dans la plupart des cas ce sont les anticorps dirigés contre le virus qui sont recherchés, ce qui est une preuve indirecte de la présence du virus. Cette méthode est utilisée en particulier pour le diagnostic des infections par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et le virus de l'hépatite C. Dans certains cas particuliers où la virémie est importante, les antigènes viraux peuvent être directement recherchés dans le sang des individus. C'est le cas par exemple, pour le diagnostic d'une infection par le virus de l'hépatite B (VHB). De manière générale, les tests immunologiques ont des performances moyennes et ceci du fait de leur manque de sensibilité et de spécificité.

Les tests immunologiques les plus performants permettent de détecter de  $10^5$  à  $10^6$  particules virales par millilitre. Or pour le VHB, un sérum est considéré comme infectieux jusqu'à  $10^2$  particules virales par millilitre (Prince et col., 1983). Le nombre de résultats faussement négatifs est donc important, puisque le seuil d'infectiosité est au moins 1000 fois plus faible que le seuil de sensibilité des tests immunologiques.

Le manque de spécificité de ces tests est directement lié aux réactions immunologiques mises en jeu. Il en résulte des résultats faussement positifs que l'on tente de mettre en évidence à l'aide d'un second test immunologique, couramment appelé "test de confirmation". Cette approche est en particulier utilisée pour la détection des virus responsables du SIDA (Syndrome d'Immunodéficience Acquise).

Comme nous l'avons vu précédemment, les performances limitées des tests immunologiques de routine peuvent être améliorées de manière importante par l'utilisation de technologies plus récentes basées sur l'hybridation moléculaire entre des molécules d'acide désoxyribonucléique (ADN) ou d'acide ribonucléique (ARN). En virologie médicale par exemple, c'est le matériel génétique du virus qui est recherché à l'aide d'une séquence sonde d'ADN ou d'ARN spécifique, ce qui représente une preuve directe de la présence éventuelle de l'agent infectieux.

Un tel diagnostic a pour finalité la mise en évidence d'au moins une séquence définie d'ADN ou d'ARN dans un échantillon biologique. Pour les infections par un pathogène (virus, bactérie, parasite, etc...) c'est une séquence précise du matériel génétique du pathogène qui est mise en évidence. Pour les maladies génétiques (plus de 3000 chez l'homme), c'est une anomalie dans une séquence précise de l'ADN génomique qui est révélée.

Pour atteindre une très grande sensibilité il est nécessaire d'amplifier *in vitro* le nombre de molécules d'ADN ou d'ARN qui doivent être mises en évidence. Les séquences d'ADN ou d'ARN ainsi amplifiées sont détectées dans un second temps par hybridation moléculaire à l'aide de sondes nucléiques. Les meilleurs résultats sont actuellement obtenus en utilisant la technique d'amplification par réaction en chaîne d'une ADN polymérase ou technique PCR ("Polymerase Chain Reaction") (Saiki et col., 1985).

La technique d'amplification enzymatique *in vitro* ou technique

d'amplification par PCR a été décrite en décembre 1985 et appliquée au diagnostic de l'anémie à hématies falciformes. Contrairement à tous les systèmes d'amplification décrits jusqu'ici, la technique PCR permet d'amplifier spécifiquement la quantité de séquences d'ADN double brin cible avant qu'elles ne soient détectées par hybridation moléculaire. Le principe de la PCR est d'utiliser de manière répétitive l'activité d'une ADN polymérase pour copier la séquence d'ADN à amplifier. Les bases technologiques de la PCR reposent sur deux points fondamentaux. Le premier point concerne l'utilisation de deux amorces oligonucléotidiques distantes de  $n$  nucléotides, l'une complémentaire du brin ADN (+), l'autre du brin ADN (-) et dont les extrémités 3' sont en regard. Le second point concerne l'utilisation répétitive de l'activité d'une ADN polymérase.

La conséquence immédiate de ces deux points est que, dans des conditions adéquates toutes les séquences néosynthétisées au cycle ( $n$ ) peuvent être utilisées comme matrice par l'ADN polymérase au cycle ( $n+1$ ). Ainsi toutes les séquences spécifiques présentes après le cycle  $n$  peuvent être copiées au cycle ( $n+1$ ). Il en résulte une amplification exponentielle du nombre de séquences spécifiques en fonction du nombre de cycles.

Plusieurs étapes successives sont nécessaires au déroulement d'un cycle de PCR. Il faut tout d'abord permettre l'hybridation spécifique d'un oligonucléotide avec une séquence d'ADN simple brin à amplifier. A partir du complexe d'hybridation ainsi formé une ADN polymérase réalise la synthèse du brin d'ADN complémentaire en utilisant l'oligonucléotide comme amorce et le brin d'ADN à amplifier comme matrice. De manière plus précise, un cycle d'amplification est composé de trois étapes. La première étape permet de réaliser la dénaturation des séquences d'ADN double brin à 90-100°C. La seconde étape permet d'aboutir à l'hybridation spécifique des oligonucléotides permise par un abaissement de la température au cours de la phase d'hybridation des amorces. La troisième étape autorise l'extension de l'oligonucléotide hybridé à une température proche de la température optimale de fonctionnement de l'ADN polymérase (37°C pour le fragment de Klenow et 72°C pour la polymérase extraite à partir de *Thermus aquaticus*) (Chien et col., 1976).

Lors du cycle d'amplification ( $n+1$ ), les séquences d'ADN simple brin sont synthétisées en utilisant comme matrices les séquences néosynthétisées au cycle ( $n$ ), ainsi que les séquences présentes à la fin

du cycle (n-1). Une séquence néosynthétisée au n<sup>ème</sup> cycle ne pourra ainsi servir d'amorce au cycle (n+1) que si sa longueur est au moins égale à la distance en bases séparant les deux amorces. Dans ces conditions, le nombre de séquences d'ADN amplifiées spécifiquement varie

5

exponentiellement par rapport au nombre de cycles.

L'amplification à partir de séquences d'ARN nécessite de réaliser une étape préliminaire de synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc). Cette approche est importante pour la détection du génome de rétrovirus comme les VIH responsables du SIDA chez l'homme (Ou et col., 1988).

10

La réaction d'hybridation moléculaire entre deux séquences d'acides nucléiques est directement liée à la température. Cette hybridation basée sur la complémentarité des bases entre deux séquences peut intervenir entre deux molécules d'ADN, entre deux molécules d'ARN ou entre une molécule d'ADN et une molécule d'ARN.

15

L'hybridation moléculaire permet donc de réaliser soit l'appariement par liaison hydrogène entre deux molécules distinctes, soit l'appariement intra-moléculaire entre deux séquences complémentaires. Dans ce dernier cas, il y a formation de structure dite secondaire de molécules d'ADN ou d'ARN. L'influence de la température sur la réaction

20

d'hybridation est essentielle et chaque séquence d'ADN (ou d'ARN) est définie par son T<sub>m</sub>, c'est à dire la température à laquelle 50 % des séquences sont appariées aux séquences complémentaires. Le T<sub>m</sub> d'une séquence précise peut être évalué expérimentalement en suivant par spectrophotométrie l'hyperchromicité à 260 nanomètres qui accompagne le désappariement (ou dénaturation) de deux séquences d'ADN complémentaires. La totalité des séquences d'ADN sont sous forme simple brin à température élevée (100°C) et sous forme double brin à température basse (10-20°C).

25

30

Le T<sub>m</sub> d'une séquence d'ADN dépend essentiellement des deux paramètres suivants: de la séquence en bases et de la force ionique du milieu. Les T<sub>m</sub> généralement rencontrés varient de 20 à 85 °C. Ainsi, la totalité des réactions d'hybridation moléculaire doivent être réalisées dans des conditions thermiques parfaitement définies et contrôlées.

35

Pour le diagnostic biologique (santé humaine, santé animale, agro-alimentaire) une séquence d'ADN ou d'ARN définie peut être détectée à l'aide de la séquence d'ADN ou d'ARN complémentaire utilisée comme sonde moléculaire. La sonde est préalablement

marquée, soit à l'aide d'un isotope radioactif, soit à l'aide d'une modification chimique. Après hybridation entre la séquence cible et la séquence sonde, cette dernière peut être détectée grâce à son marquage. Il a été montré par plusieurs équipes de recherche que la détection d'une

5 molécule unique d'ADN ou d'ARN est possible en utilisant séquentiellement la PCR et la détection du produit d'amplification spécifique à l'aide d'une sonde nucléique (Larzul et col., 1989). Un tel résultat procure un gain de sensibilité d'un facteur  $10^4$  à  $10^5$  par comparaison avec les performances des tests immunologiques.

10 D'autre part, la spécificité des réactions d'hybridation moléculaire est excellente puisqu'il est possible de mettre en évidence une infime variation dans la séquence des bases composant le matériel génétique d'un individu. La modification d'une seule base sur les 3.500.000.000 de bases qui composent le génome humain peut ainsi être mise en évidence.

15 Pour le diagnostic en biologie, la PCR est donc un outil de choix dont le développement en routine est intimement lié à son automatisation complète. Deux conceptions différentes d'appareil permettant d'automatiser la PCR ont jusqu'ici été décrites. Le premier appareil est décrit dans la demande EP-A<sub>2</sub>-0 236 069 et sera appelé dans la présente

20 description "appareil Cetus", du nom de la société ayant déposé la demande. Le second appareil est décrit dans la demande BF 88.08.536 et sera appelé dans la présente description "appareil Pasteur", du nom de l'Institut ayant déposé la demande. L'appareil Cetus et l'appareil Pasteur permettent de soumettre de manière cyclique un nombre donné

25 d'échantillons biologiques aux conditions de températures caractérisant un cycle de PCR. Trois températures différentes sont généralement utilisées au cours du cycle précité, afin de permettre successivement la dénaturation des séquences d'acides nucléiques double-brin, l'hybridation des amorces oligonucléotidiques, et l'extension de ces

30 dernières par une ADN polymérase. La conception des deux appareils précédemment cités est basée sur le traitement d'un lot d'échantillons biologiques distincts, chaque échantillon étant contenu dans sa propre enceinte close et immobile par rapport à la dite enceinte. De manière habituelle, l'enceinte close est un tube jetable en matière plastique

35 (polypropylène par exemple) d'une capacité de 0,5 à 1,5 millilitres équipé d'un bouchon amovible.

L'appareil Cetus est caractérisé par le fait qu'un lot d'enceintes (48

tubes de 0,75 millilitre) contenant les échantillons est placé dans un récepteur fixe à l'intérieur duquel circule un liquide thermorégulé. Le transfert d'énergie thermique qui a lieu entre le dit liquide thermorégulé et l'échantillon biologique permet de réguler la température de ce dernier.

5 Deux exemples sont proposés dans la demande EP-A<sub>2</sub>-0 236 069 pour la réalisation technique de cet appareil. Dans le premier exemple, le récepteur est en relation avec un composant à effet Peltier (chauffage et refroidissement), qui est lui même en relation avec un réservoir. Dans le

10 second exemple, le récepteur est en relation, par l'intermédiaire d'un système de valves automatiques, avec deux réservoirs contenant un liquide thermorégulé. L'un des réservoirs contient un liquide dont la température est comprise entre 80°C et 105°C, et l'autre réservoir contient un liquide dont la température est comprise entre 35°C et 60°C.

L'appareil Pasteur est caractérisé par le fait qu'un lot d'enceintes

15 (49 tubes de 1,50 millilitres ou 96 tubes de 0,75 millilitre) contenant les échantillons biologiques est déplacé mécaniquement entre trois récepteurs indépendants, chaque récepteur étant à une température constante au cours d'un cycle de PCR. Le déplacement du dit lot est assuré par le bras articulé d'un robot de transfert. Un récepteur est

20 constitué d'une cuve thermostatée équipée d'un élément chauffant.

L'appareil Cetus a le désavantage d'utiliser un fluide qui est chauffé ou refroidi dans une cuve puis transféré par l'intermédiaire d'un circuit non thermorégulé de la dite cuve vers le récepteur d'échantillons. L'utilisation du dit fluide intermédiaire dans de telles conditions augmente

25 très significativement l'inertie thermique du système et diminue sensiblement la précision de la température réellement atteinte par l'échantillon biologique. Par rapport à la technique PCR, l'utilisation de l'appareil Cetus pose donc deux problèmes essentiels. Le premier problème est que les variations de température de l'environnement

30 immédiat de l'échantillon biologique sont lentes (au plus égales à 1°C par minute) ce qui, d'une part allonge de manière importante la durée globale de l'amplification par PCR, et d'autre part augmente très significativement la consommation d'ADN polymérase thermorésistante dont le pourcentage de perte d'activité augmente de manière très importante

35 entre 80°C et 100°C. Le second problème est le manque de contrôle de la température réelle de l'échantillon biologique qui est différente de la température du fluide intermédiaire dans la cuve thermorégulée

précédemment citée. La différence de température précitée peut avoir de graves conséquences sur la qualité de la PCR, en particulier lors de l'étape d'hybridation des amorces oligonucléotidiques au cours de laquelle la température désirée par l'expérimentateur est le garant de la spécificité de la réaction d'amplification.

5 L'appareil Pasteur a le désavantage de nécessiter un système mécanique complexe et encombrant décrit dans la première revendication comme "un robot de transfert successif des portoirs".

10 L'appareil Cetus et l'appareil Pasteur ont le grand désavantage de travailler sur des échantillons biologiques provisoirement enfermés, pendant l'amplification par PCR, dans une enceinte close précise, ce qui a de graves conséquences que nous allons maintenant développer. Qu'il s'agisse d'une part, de la description et des revendications des demandes EP-A<sub>2</sub>-0 236 069 et BF 88.08.536, d'autre part du savoir faire utilisé dans  
15 tous les laboratoires de recherche, les dites enceintes sont des tubes jetables équipés d'un bouchon amovible. Ainsi, pour les deux appareils cités, l'échantillon biologique doit être introduit dans l'enceinte avant l'amplification par PCR puis prélevé de l'enceinte après la dite amplification. De manière habituelle, comme l'enceinte est un tube jetable  
20 équipé d'un bouchon amovible, l'introduction et le prélèvement de l'échantillon précédemment cités sont réalisés par ouverture et fermeture du dit bouchon amovible. Les conceptions de l'appareil Cetus et de l'appareil Pasteur sont donc figées sur l'utilisation d'enceintes closes, du type tube avec bouchon amovible, ce qui rend complexe l'exécution d'un  
25 procédé biologique structuré comme un ensemble d'étapes séquentielles dont l'une d'entre elles est l'amplification par PCR. En effet, au cours du dit procédé biologique, l'échantillon doit subir plusieurs fois consécutives les déplacements suivants: insertion dans une enceinte, prélèvement dans la même enceinte, puis insertion dans une nouvelle enceinte. L'appareil  
30 Cetus et l'appareil Pasteur sont en particulier inadaptés pour le traitement par PCR d'un échantillon qui se déplace à l'intérieur d'une enceinte de type capillaire. Le dit déplacement à l'intérieur d'une enceinte pouvant être une solution intéressante pour l'exécution d'un processus biologique structuré comme un ensemble d'étapes séquentielles.

35 On connaît d'autre part la demande GB 89 17 963 qui n'était pas publiée au moment du dépôt de la présente demande, et qui décrit un appareil permettant d'automatiser la Technique PCR. Le dit appareil reçoit



au moins une enceinte de type capillaire à l'intérieur de laquelle l'échantillon biologique est déplacé entre différentes zones thermorégulées. Dans la description détaillée de la demande GB 89 17 963, le déplacement de l'échantillon à l'intérieur du capillaire est assuré  
5 par un système magnétique composé d'une partie entraîneuse, située à l'extérieur du capillaire, et d'une partie entraînée, située à l'intérieur du capillaire de part et d'autre de l'échantillon biologique. La partie entraîneuse pouvant être un aimant et la partie entraînée pouvant être une suspension de particules métalliques dans de l'huile minérale. Le  
10 système magnétique d'entraînement précédemment cité a le désavantage d'être délicat à mettre en oeuvre du fait de l'état liquide de l'échantillon biologique et de la faible taille du capillaire (de 1 millimètre à 3 millimètres).

Dans la présente description et dans les revendications, on  
15 entendra par le terme "cycle thermique", les variations parfaitement définies de la température en fonction du temps susceptibles de servir d'unité de traitement à caractère répétitif. Un traitement est habituellement structuré comme une succession de cycles thermiques identiques ou semblables, chaque cycle étant également une unité de fonction. Pour la  
20 PCR, un cycle thermique est l'unité de fonction permettant de doubler spécifiquement le nombre d'une séquence définie d'ADN. Pour ce faire, un cycle thermique de PCR appliqué à un échantillon biologique doit permettre de réaliser successivement, la dénaturation des séquences d'ADN, l'hybridation des amorces oligonucléotidiques, et l'extension des  
25 dites amorces par une ADN polymérase. Par exemple, lorsqu'une ADN polymérase thermorésistante est utilisée, un cycle thermique de PCR doit permettre d'incuber un échantillon biologique aux températures fonctionnelles de 95°C, 50°C et 72°C respectivement, les variations entre ces valeurs ainsi que les temps d'incubation à chaque température  
30 fonctionnelle devant par ailleurs être définis.

Dans la présente description ainsi que dans les revendications, les termes "enceinte de type capillaire" ou "capillaire" seront utilisés pour une structure torique pouvant contenir un liquide dont le positionnement dépend principalement de l'effet de capillarité sur la paroi interne du tore.  
35 Pour les applications décrites en détails dans la présente invention, l'enceinte de type capillaire est avantageusement un tuyau souple en matière plastique dont le diamètre externe peut varier de 4 à 1 millimètres

et le diamètre interne de 3 à 0,2 millimètres.

5 Dans la présente description ainsi que dans les revendications, on entendra par le terme "écrasement de l'enceinte de type capillaire", ou "écrasement du capillaire", l'action mécanique d'une pièce d'appui sur le capillaire résultant en une déformation localisée du dit capillaire caractérisée par le fait, d'une part que deux surfaces internes, opposées par rapport à l'axe du tore, sont amenées en contact, d'autre part qu'elle empêche le passage d'un fluide à l'intérieur du tore au niveau de la zone d'écrasement.

10 Par ailleurs, on entendra par le terme "galet" la pièce d'appui précitée responsable de l'écrasement du capillaire.

15 Dans la présente description ainsi que dans les revendications, on entendra par les termes "aval" et "amont" de l'échantillon biologique des positions situées sur le capillaire, la position amont se trouvant dans la partie par laquelle l'échantillon a été initialement introduit dans le capillaire placé dans l'appareil décrit dans la présente invention, la position aval se trouvant dans la partie opposée à la partie amont par rapport à l'échantillon.

20 L'objectif principal de la présente invention est l'automatisation de la technique PCR appliquée à un échantillon biologique contenu dans une enceinte autre qu'un tube équipé d'un bouchon amovible. Un tel résultat peut être atteint par l'utilisation d'un appareil d'exécution automatique répétée d'un cycle thermique permettant le traitement d'au moins un échantillon biologique caractérisé par le fait, d'une part que  
25 l'échantillon est mis en mouvement à l'intérieur d'une enceinte du type capillaire souple entre au moins deux zones thermorégulées, d'autre part que le système d'entraînement de l'échantillon biologique comporte au moins un galet écrasant le capillaire, et tel que le déplacement du dit système d'entraînement le long du capillaire ait un effet d'entraînement de  
30 l'échantillon biologique à l'intérieur du capillaire.

L'appareil précité peut avantageusement être caractérisé par le fait, d'une part que le système d'entraînement comporte deux galets situés l'un en amont et l'autre en aval de l'échantillon biologique, chaque galet étant de forme torique et pouvant tourner autour de son axe de symétrie,  
35 d'autre part que le système d'entraînement, constitué des deux galets réunis à l'aide d'au moins une pièce de jonction, a un mouvement de translation parallèle au capillaire souple maintenu rectiligne dans la zone

de mouvement du dit système d'entraînement.

De manière préférentielle, au moins deux zones thermorégulées sont distinctes, chacune étant composée d'une structure plane sur laquelle le capillaire souple est en contact.

5            Selon une première version, l'appareil en question est préférentiellement caractérisé par le fait, d'une part que le traitement d'au moins un échantillon biologique est la réaction en chaîne de la polymérase (PCR), d'autre part qu'il possède quatre zones thermorégulées disposées en série, une première zone est régulée à une  
10   température permettant la dénaturation des séquences d'acide nucléique, une deuxième zone est régulée à une température permettant le refroidissement rapide de l'échantillon biologique à partir de la température occasionnant la dénaturation jusqu'à une température ne permettant que l'hybridation spécifique des amorces oligonucléotidiques,  
15   une troisième zone est régulée à la température ne permettant que l'hybridation spécifique des amorces oligonucléotidiques et l'initialisation de leur extension, une quatrième zone est régulée à une température permettant une extension optimale des amorces oligonucléotidiques.

          Selon une seconde version, l'appareil précité est  
20   avantageusement caractérisé par le fait, d'une part que le traitement d'au moins un échantillon biologique est la réaction en chaîne de la polymérase (PCR), d'autre part qu'il possède au moins trois zones thermorégulées, l'une étant embarquée sur le système d'entraînement et possédant une thermorégulation qui n'est activée qu'à un moment précis  
25   du traitement. L'activation de la thermorégulation précitée doit permettre, en particulier, le refroidissement rapide de l'échantillon biologique d'une température permettant la dénaturation jusqu'à une température ne permettant que l'hybridation spécifique des amorces oligonucléotidiques.

          Afin de faciliter le positionnement de l'échantillon biologique au  
30   moins en début d'expérience, l'appareil en question est caractérisé par le fait que le système d'entraînement possède deux positions de stationnement distinctes, de sorte que l'une des positions n'autorise pas l'écrasement du capillaire et que l'autre position ait cet effet d'écrasement, cette caractéristique permettant le positionnement initial de l'échantillon  
35   biologique entre les deux galets à partir d'une position proximale par rapport au dit système d'entraînement.

De manière préférentielle, l'appareil décrit dans la présente

invention est caractérisé, d'une part par le fait que la force motrice, responsable du déplacement du système d'entraînement le long du capillaire avec un effet d'entraînement de l'échantillon biologique, résulte de l'action d'un moteur électrique sur au moins une pièce de jonction, d'autre part par le fait que le déplacement actif du système d'entraînement provoque une rotation passive des deux galets qui le composent autour de leur axe propre du fait du contact intime entre les galets et le capillaire.

Afin d'apporter une meilleure qualité du traitement d'un échantillon biologique, l'appareil concerné est avantageusement caractérisé par le fait qu'il est équipé d'au moins un capteur placé à l'intérieur d'une enceinte de mesure semblable au capillaire souple contenant l'échantillon biologique, le dit capteur pouvant fournir la température réelle instantanée d'un échantillon biologique de référence contenu dans l'enceinte de mesure.

Pour un meilleur confort d'utilisation, l'appareil en question est caractérisé par le fait qu'un ordinateur programmable par l'utilisateur commande, le déplacement du système d'entraînement le long du capillaire, le déplacement du système d'entraînement entre les deux positions de stationnement précédemment définies, la température de consigne instantanée de chaque zone thermorégulée, l'activation et la désactivation de la thermorégulation de certaines zones, et le nombre total de cycles thermiques.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère aux dessins annexés dans lesquels:

- la figure 1 représente une vue schématique en coupe longitudinale d'un mode de réalisation préférentiel de l'appareil selon l'invention.

- la figure 2 représente une vue schématique en coupe transversale du mode de réalisation préférentiel de la figure 1.

- la figure 3 représente un schéma fonctionnel de positionnement du système d'entraînement et de l'échantillon biologique contenu dans l'enceinte de type capillaire.

L'appareil représenté en détails dans les figures 1 et 2 comporte une base (1) dont la face supérieure plane est destinée à recevoir au moins une enceinte fixe de type capillaire souple (10) pouvant contenir un échantillon biologique. La base (1) reçoit les éléments thermorégulés (7),

(8) et (9) disposés en série. Un isolant thermique est contenu dans l'espace périphérique (6) de manière, d'une part à protéger les éléments thermorégulés entre eux, d'autre part à protéger la base par rapport aux éléments (7), (8) et (9). Les éléments (7) et (8) sont équipés de moyens de chauffage, et l'élément (9) est équipé de moyens de chauffage et de refroidissement utilisant un composant à effet Peltier. Chaque élément thermorégulé est équipé d'un système de régulation thermique lui permettant, à un instant donné, d'être à une température précise déterminée par l'expérimentateur. (7) et (8) peuvent être régulés de la température ambiante jusqu'à 120°C. (9) peut être régulé de 2°C jusqu'à 100°C.

Par rapport à un tel appareil (figures 1 et 2), le nombre d'éléments thermorégulés, ainsi que la gamme de températures caractérisant chacun d'eux, peuvent être différents. Ainsi, il peut être envisagé de n'utiliser que deux éléments thermorégulés, l'un étant équipé de moyens de chauffage et l'autre étant équipé d'un composant à effet Peltier. Une autre possibilité est de disposer d'un appareil muni de quatre éléments thermorégulés dont trois éléments équipés de moyens de chauffage et un élément équipé d'un composant à effet Peltier. Par ailleurs, il peut être avantageux d'améliorer l'échange thermique entre un élément thermorégulé et l'échantillon contenu le capillaire. Pour ce faire, la face supérieure de l'élément précité peut être creusée de sillons parallèles recevant les capillaires. Une telle option permet d'avoir un contact plus intime entre la source thermique et le capillaire.

L'appareil décrit en détails dans la présente invention contient un système d'entraînement, constitué de deux galets (3,5) et de deux pièces de jonction (4,19), qui peut être mis en mouvement de translation parallèle au capillaire (10) par l'intermédiaire de deux courroies d'entraînement (14,23) fixées sur le système d'entraînement. Chaque courroie (14) (figure 1) est tendue entre deux poulies (13,15), dont l'une seulement est une poulie motrice (15). Les deux poulies motrices (15,22) (figure 2) sont solidaires du même axe (24) qui peut être mis en rotation du fait de sa connection avec un moteur électrique (26). Afin de permettre une libre rotation du galet (3) autour de son axe (25), deux roulement à billes (18) sont placés à chaque extrémités du dit galet. Le guidage en translation du système d'entraînement est obtenu par l'encastrement des deux extrémités de l'axe (25) (figure 2) de chaque galet (3) dans les rainures

(21,27) placées sur les faces latérales internes du couvercle (12). Le guidage précité est facilité par l'utilisation de roulements à billes (17).

Selon une autre version de l'appareil en question, il peut être conçu un système d'entraînement ne portant qu'un seul galet et ayant une fonctionnalité proche de celle obtenue avec l'appareil décrit sur les figures 1 et 2. Bien que pouvant entraîner un échantillon dans de bonnes conditions, un système d'entraînement à un seul galet est cependant mal adapté à des traitements thermiques de l'échantillon biologique à des températures supérieures à 70°C. Dans une nouvelle version encore, l'appareil décrit dans cette invention peut être équipé d'un système d'entraînement possédant deux galets fixes par rapport aux pièces de jonction. Dans ce cas, les galets, qui ne sont pas en mouvement de rotation sur eux même, glissent sur l'enceinte de type capillaire tout en l'écrasant. Ce glissement nécessite l'utilisation de matériaux adaptés pour le capillaire et les galets. Il peut également être envisagé dans une autre conception de l'appareil de faire porter par le système d'entraînement l'un des éléments thermorégulés, comme par exemple un élément équipé d'un composant à effet Peltier. Par ailleurs et dans une nouvelle conception d'appareil encore, la force motrice responsable du déplacement du système d'entraînement peut s'appliquer directement sur l'axe d'un au moins des galets, ci-après appelé galet moteur. Le galet moteur est semblable à celui décrit dans la figure 2, sauf qu'il est solidaire de son axe propre.

L'appareil représenté dans les figures 1 et 2 possède un système permettant aux galets (3) et (5) d'être, soit en position de stationnement haute, soit en position de stationnement basse. La position de stationnement haute ne permet pas aux galets d'écraser l'enceinte de type capillaire, alors que dans la position de stationnement basse les galets sont assez proches de la base (1) pour écraser le capillaire (10). Qu'il soit en position de stationnement basse ou haute, le système d'entraînement peut être mis en mouvement de translation parallèle au capillaire. L'établissement des galets en position haute ou basse est obtenu par la mise en mouvement, grâce à la connection (16) avec un moteur électrique, d'un pointeau (2) porté par le couvercle (12). Le pointeau étant à la fois solidaire du couvercle et en appui sur la base (1), le déplacement du pointeau sur un axe perpendiculaire au plan du couvercle entraîne une rotation de faible amplitude du couvercle par

rapport à l'axe (11). Dans sa rotation, le couvercle entraîne les éléments qu'il porte et le système d'entraînement en particulier. Des baguettes (20) disposées de part et d'autre de la base (1) permettent de garder une distance minimale constante entre chaque galet et la base.

5 L'appareil en question, représenté dans les figures 1 et 2, est très bien adapté pour exécuter automatiquement la technique de réaction en chaîne de la polymérase ou technique PCR. Pour ce faire, l'échantillon biologique liquide (figure 3) devant être soumis à la PCR est introduit au niveau de (ri) dans la partie de capillaire (10) placée dans l'appareil, puis  
10 placé en position proximale (e1) par rapport au système d'entraînement qui est en position de stationnement basse (p1). Le déplacement du système d'entraînement de (p1) jusqu'à (p2) entraîne le déplacement de l'échantillon de la position (e1) jusqu'à la position (e2). Le système d'entraînement passe alors en position de stationnement haute (p3), puis  
15 se déplace jusqu'à une nouvelle position de stationnement haute (p4). Au cours du déplacement du système d'entraînement entre les positions (p3) et (p4), l'échantillon biologique reste en position (e2) du fait que le capillaire ne soit pas écrasé lorsque le système d'entraînement est en position de stationnement haute. Le passage du système d'entraînement  
20 de la position (p4) vers une position de stationnement basse (p5) a pour conséquence l'écrasement du capillaire (10) par les galets. Le galet (3) écrase le capillaire en amont de l'échantillon biologique et le galet (5) écrase le capillaire en aval de l'échantillon biologique. Au cours de la suite du traitement, correspondant au déroulement de la PCR proprement  
25 dite, le maintien du système d'entraînement en position basse et son déplacement entre deux quelconques des positions (p5), (p6) et (p7) ont un effet d'entraînement de l'échantillon biologique, situé entre les deux galets, entre les zones (A), (B) et (C) respectivement. A partir du premier positionnement du système d'entraînement en position (p5), l'échantillon  
30 peut effectivement être soumis aux différentes températures fonctionnelles permettant de réaliser la PCR. Pour ce faire, les zones (A), (B) et (C) peuvent être thermorégulées à 95°C, 15°C et 72°C respectivement. L'échantillon en position (e2) est porté à 95°C, soit à une température permettant la dénaturation des ADN double-brin. L'échantillon est ensuite  
35 déplacé de (e2) vers (e3) où il est refroidi jusqu'à 50°C grâce la thermorégulation de la zone (B) à 15°C. Le refroidissement de l'échantillon jusqu'à 50°C permet une hybridation spécifique des amorces

oligonucléotidiques sur les séquences d'ADN cible. De la position (e3), l'échantillon est déplacé jusqu'à la position (e4), située dans la zone (C), où il est porté à 72°C, soit à une température proche de la température optimale de fonctionnement de l'ADN polymérase thermorésistante utilisée. Le positionnement successif de l'échantillon en (e2), (e3), puis (e4) permet de soumettre l'échantillon à un cycle complet de PCR. Le déplacement de l'échantillon de (e4) vers (e2) permet donc d'initier un nouveau cycle de PCR. Le nombre total de cycles de PCR généralement utilisé varie de 20 à 45 en fonction de la nature de l'échantillon biologique initial et du modèle biologique de PCR utilisé. Dans certains cas particuliers, caractérisés par une très faible quantité d'ADN cible contenu dans l'échantillon biologique initial et un faible rendement de la PCR, un nombre total de cycles de PCR supérieur à 50 peut être nécessaire.



## REFERENCES CITEES

- Chien A., Edgar D.B. et Trela J.M. (1976) Journal of Bacteriology 127, 3: 1550-1557.
- 5 - Larzul D., Chevrier D. et Guesdon J.-L. (1989) Molecular and Cellular Probes 3: 45-57.
- Ou C.Y., Kwok S., Mitchell S.W., Mack D.H., Sninsky J.J., Krebs J.W., Feorino P., Warfield D. et Schochetman G. (1988) Science 239: 295-297.
- 10 - Prince A. M., Stephan W. et Brotman B.(1983) Review in Infectious Diseases, 5:92-107.
- Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A. et Arnheim N. (1985) Science, 230: 1350-1354.
- Sambrook J., Fritsch E.F. et Maniatis T. (1989) "Molecular Cloning, a laboratory manual", seconde édition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 15 - EP A2-0236069 (1987), inventeurs: Johnson L.J., Leath R.A., Mezei L.M., Widunas J.T. et Wennberg T.J.
- BF 88.08.536 (1988), inventeurs: Larzul D., Guesdon J.-L. et Gerlier J.-P.
- 20 - GB 89 17 963 (1989), inventeur: Larzul D.

## REVENDECATIONS

1/ Appareil d'exécution automatique répétée d'un cycle thermique permettant le traitement d'au moins un échantillon biologique caractérisé par le fait, d'une part que l'échantillon biologique est mis en mouvement à l'intérieur d'une enceinte du type capillaire souple (10) entre au moins deux zones thermorégulées choisies parmi 7, 8 et 9, d'autre part que le système d'entraînement de l'échantillon biologique comporte au moins un galet écrasant le capillaire (10), et tel que le déplacement du dit système d'entraînement le long du capillaire ait un effet d'entraînement de l'échantillon biologique à l'intérieur du capillaire.

2/ Appareil selon la revendication 1 caractérisé par le fait, d'une part que le système d'entraînement comporte deux galets (3,5) situés l'un en amont et l'autre en aval de l'échantillon, chaque galet étant de forme torique et pouvant tourner autour de son axe de symétrie (25), d'autre part que le système d'entraînement, constitué des deux galets réunis à l'aide d'au moins une pièce de jonction (4,19), a un mouvement de translation parallèle au capillaire souple maintenu rectiligne dans la zone de mouvement du dit système d'entraînement.

3/ Appareil selon les revendications 1 et 2 caractérisé par le fait qu'au moins deux zones thermorégulées choisies parmi 7, 8 et 9 sont distinctes, chacune étant composée d'une structure plane sur laquelle le capillaire souple est en contact.

4/ Appareil selon les revendications 1 à 3 caractérisé par le fait, d'une part que le traitement d'au moins un échantillon biologique est la réaction en chaîne de la polymérase (PCR), d'autre part qu'il possède quatre zones thermorégulées disposées en série, une première zone est régulée à une température permettant la dénaturation des séquences d'acide nucléique, une deuxième zone est régulée à une température permettant le refroidissement rapide de l'échantillon biologique de la température occasionnant la dénaturation jusqu'à une température ne permettant que l'hybridation spécifique des amorces oligonucléotidiques, une troisième zone est régulée à la température ne permettant que l'hybridation spécifique des amorces oligonucléotidiques et l'initialisation de leur extension, une quatrième zone est régulée à une température permettant une extension optimale des amorces oligonucléotidiques.

5/ Appareil selon les revendications 1 à 3 caractérisé par le fait, d'une part que le traitement d'au moins un échantillon biologique est la

réaction en chaîne de la polymérase (PCR), d'autre part qu'il possède au moins trois zones thermorégulées, l'une étant embarquée sur le système d'entraînement et possédant une thermorégulation qui n'est activée qu'à un moment précis du traitement.

5           6/ Appareil selon les revendications 1 à 5 caractérisé par le fait que le système d'entraînement possède deux positions de stationnement distinctes, de sorte que l'une des positions (p4,p3) n'autorise pas l'écrasement du capillaire et que l'autre position (p1,p2,p5,p6,p7) ait cet effet d'écrasement.

10           7/ Appareil selon les revendications 1 à 6 caractérisé par le fait, d'une part que la force motrice, responsable du déplacement du système d'entraînement le long du capillaire avec un effet d'entraînement de l'échantillon biologique, résulte de l'action d'un moteur électrique (26) sur au moins une pièce de jonction (4,19), d'autre part que le  
15           déplacement actif du système d'entraînement provoque une rotation passive des deux galets (3,5) autour de leur axe propre (25) du fait du contact intime entre les galets et le capillaire (10).

              8/ Appareil selon les revendications 1 à 7 caractérisé par le fait qu'il est équipé d'au moins un capteur placé à l'intérieur d'une enceinte de  
20           mesure semblable au capillaire souple contenant l'échantillon biologique, le dit capteur pouvant fournir la température réelle instantanée d'un échantillon biologique de référence contenu dans l'enceinte de mesure.

              9/ Appareil selon les revendications 1 à 8 caractérisé par le fait  
25           qu'un ordinateur programmable par l'utilisateur commande, le déplacement du système d'entraînement le long du capillaire, le déplacement du système d'entraînement entre les deux positions de stationnement, la température de consigne instantanée de chaque zone thermorégulée, l'activation et la désactivation de la thermorégulation de  
30           certaines zones, et le nombre total de cycles thermiques.

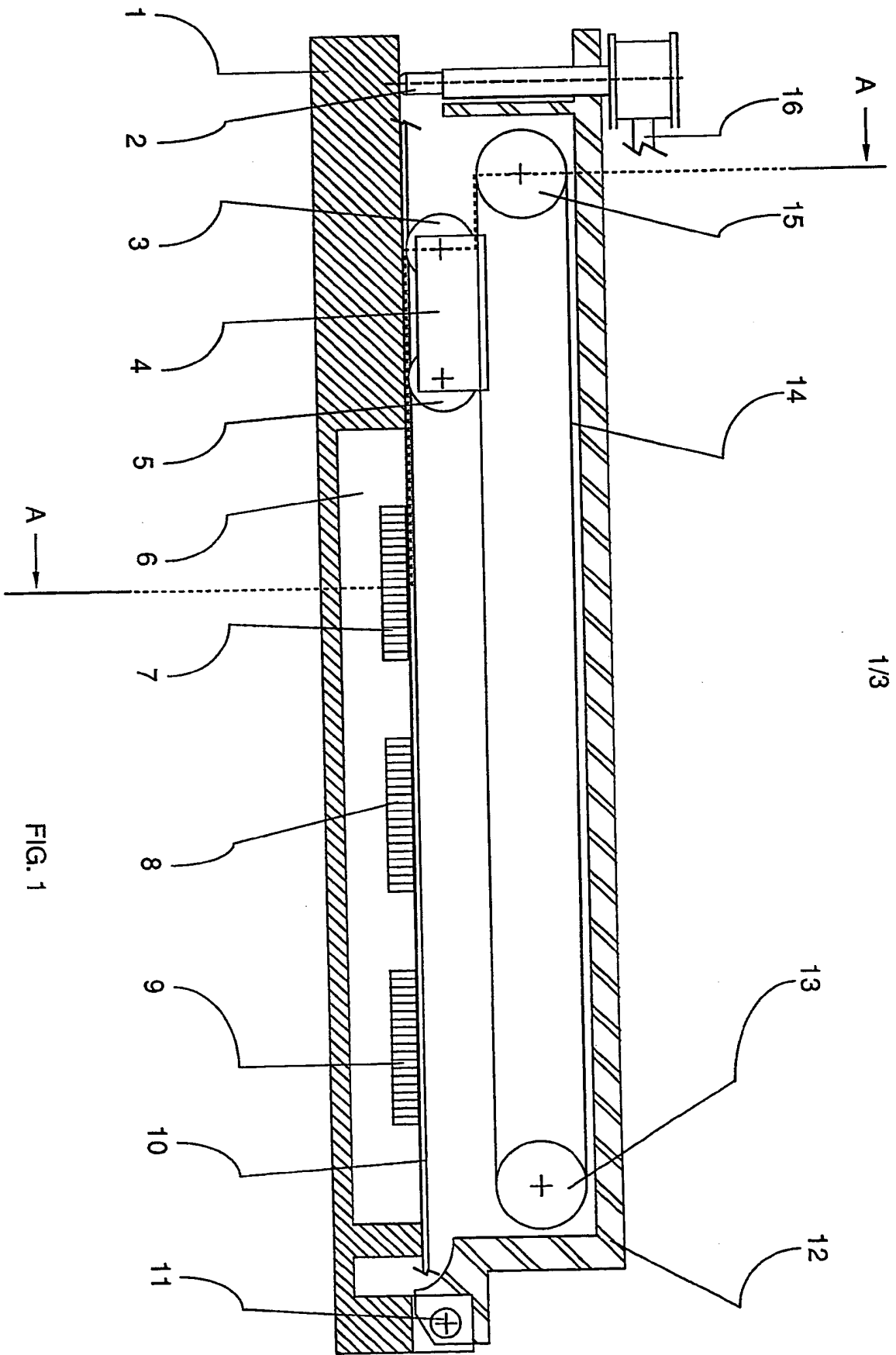


FIG. 1

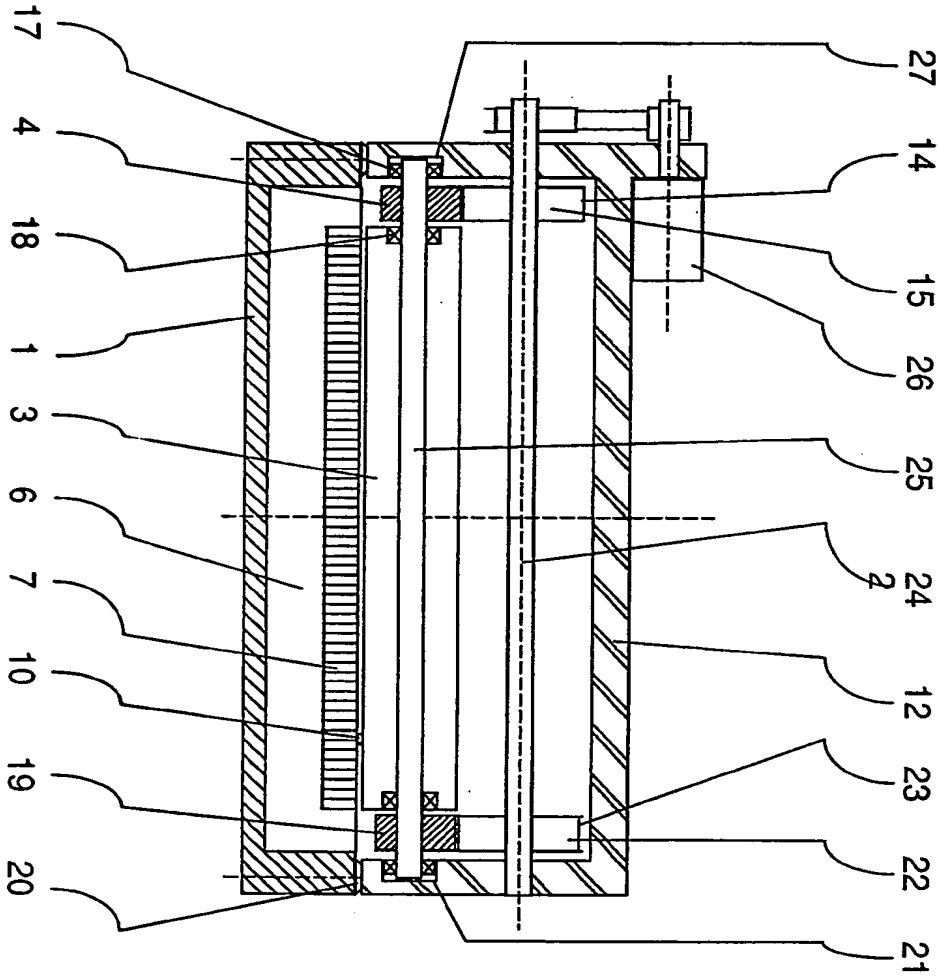


FIG.2 Coupe suivant AA

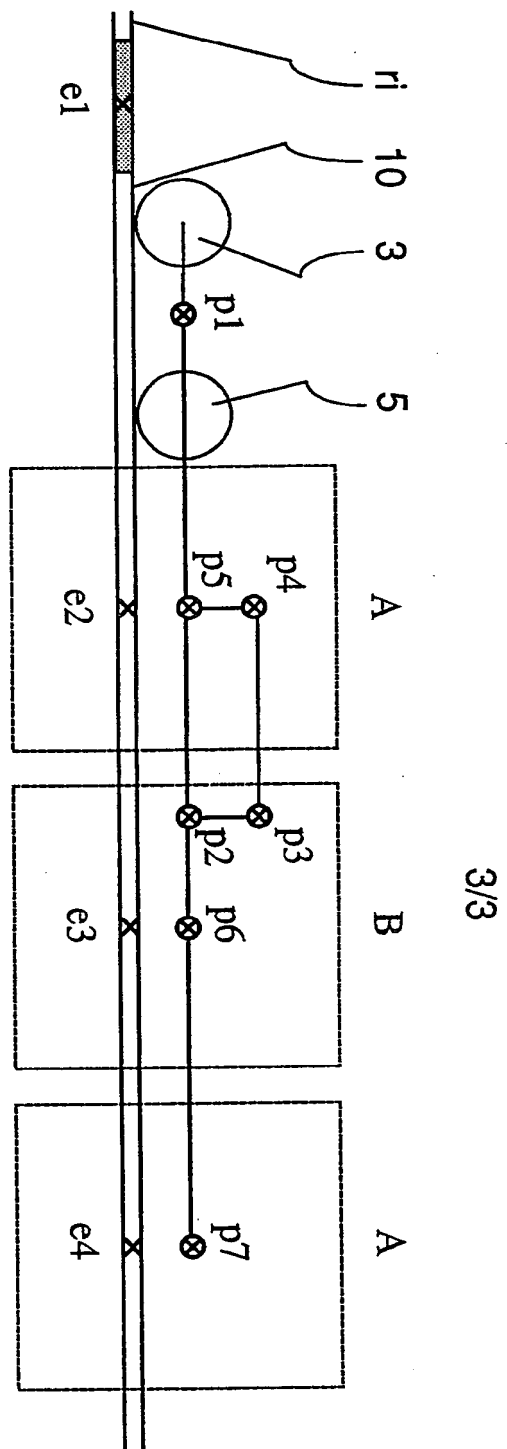


FIG. 3

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	WO-A-9 005 023 (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FORDERUNG DER WISSENSCHAFTEN) * abrégé * * page 1, alinéa 1 * * page 3, alinéa 1 - page 5, alinéa 2 * * figures 1-3 *	1, 3, 5, 8, 9
A	EP-A-0 402 994 (EASTMAN KODAK COMPANY) * abrégé * * colonne 1, ligne 1 - ligne 5 * * colonne 4, ligne 21 - colonne 7, ligne 30 * * figures 1-5 *	1
A	US-A-4 300 906 (K. M. NEGERSMITH) * abrégé * * colonne 2, ligne 23 - colonne 4, ligne 27 * * figures 1,2 *	1, 2
A	DE-A-2 525 129 (PASSAVANT-WERKE MICHELBA- CHER HUTTE) * page 1, alinéa 1 * * page 5, alinéa 3 - page 7, alinéa 1 * * figure *	2, 6
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.4)
		B 01 J C 12 M G 01 N B 01 L G 05 D C 12 Q F 04 B
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
01 OCTOBRE 1991		STEVNSBORG N.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		

